

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

#3
Cont.

Concise Explanation of the Japanese References

Reference 6

This specification discloses an amino acid sequence of cytochrome P450_{c25} isolated from rat liver, and the DNA sequence encoding this protein.

The inventors constructed a lambda gt11 cDNA expression library from rat liver, screened with antibodies raised against purified P450_{c25}, and selected the positive clone designated pLMT25. The cDNA insert of this clone was sequenced, and the amino acid sequence was predicted. The amino acid sequence showed 73% identity with a mitochondrial P450 derived from rabbit liver which catalyzes the 26- (or 27-) hydroxylation of 5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α -triol. This result showed that this protein is cytochrome P450_{c25}, which catalyzes 25-hydroxylation of vitamin D, in rat liver mitochondria.

⑫ 公開特許公報(A)

平3-232493

⑤ Int. Cl.³ 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 平成3年(1991)10月16日
 C 12 N 15/53 ZNA 7236-4B
 //(C 12 N 1/21
 C 12 R 1:19)
 8717-4B C 12 N 15/00 A
 審査請求 未請求 請求項の数 9 (全10頁)

⑭ 発明の名称 チトクロムP450_{c₂}遺伝子

⑯ 特 願 平2-27711

⑰ 出 願 平2(1990)2月6日

⑱ 発 明 者 奥 田 九 一 郎 広島県広島市佐伯区美鈴が丘南1丁目7番4号

⑲ 出 願 人 住友化学工業株式会社 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

⑳ 代 理 人 弁理士 諸 石 光 熙 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

チトクロムP450_{c₂}遺伝子

2. 特許請求の範囲

- (1) チトクロムP450_{c₂}をコードする遺伝子
 (2) ラット肝のチトクロムP450_{c₂}をコードする遺伝子
 (3) 下記アミノ酸配列をコードする塩基配列を含む特許請求の範囲第2項記載の遺伝子

MetAlaValLeuSerArgMetArgLeuArgTrpAlaLeuLeu
 AspThrArgValMetGlyHisGlyLeuCysProGlnGlyAla
 ArgAlaLysAlaAlaIleProAlaAlaLeuArgAspHisGlu
 SerThrGluGlyProGlyThrGlyGlnAspArgProArgLeu
 ArgSerLeuAlaGluLeuProGlyProGlyThrLeuArgPhe
 LeuPheGlnLeuPheLeuArgGlyTyrValLeuHisLeuHis
 GluLeuGlnAlaLeuAsnLysAlaLysTyrGlyProMetTrp
 ThrThrThrPheGlyThrArgThrAsnValAsnLeuAlaSer
 AlaProLeuLeuGluGlnValMetArgGlnGluGlyLysTyr
 ProIleArgAspSerMetGluGlnTrpLysGluHisArgAsp
 HisLysGlyLeuSerTyrGlyIlePheIleThrGlnGlyGln

GlnTrpTyrHisLeuArgHisSerLeuAsnGlnArgMetLeu
 LysProAlaGluAlaAlaLeuTyrThrAspAlaLeuAsnGlu
 ValIleSerAspPheIleAlaArgLeuAspGlnValArgThr
 GluSerAlaSerGlyAspGlnValProAspValAlaHisLeu
 LeuTyrHisLeuAlaLeuGluAlaIleCysTyrIleLeuPhe
 GluLysArgValGlyCysLeuGluProSerIleProGluAsp
 ThrAlaThrPheIleArgSerValGlyLeuMetPheLysAsn
 SerValTyrValThrPheLeuProLysTrpSerArgProLeu
 LeuProPheTrpLysArgTyrMetAsnAsnTrpAspAsnIle
 PheSerPheGlyGluLysMetIleHisGlnLysValGlnGlu
 IleGluAlaGlnLeuGlnAlaAlaGlyProAspGlyValGln
 ValSerGlyTyrLeuHisPheLeuLeuThrLysGluLeuLeu
 SerProGlnGluThrValGlyThrPheProGluLeuIleLeu
 AlaGlyValAspThrThrSerAsnThrLeuThrTrpAlaLeu
 TyrHisLeuSerLysAsnProGluIleGlnGluAlaLeuHis
 LysGluValThrGlyValValProPheGlyLysValProGln
 AsnLysAspPheAlaHisMetProLeuLeuLysAlaValIle
 LysGluThrLeuArgLeuTyrProValValProThrAsnSer
 ArgIleIleThrGluLysGluThrGluIleAsnGlyPheLeu
 PheProLysAsnThrGlnPheValLeuCysHisTyrValVal

SerArgAspProSerValPheProGluProGluSerPheGln
ProHisArgTrpLeuArgLysArgGluAspAspAsnSerGly
IleGlnHisProPheGlySerValProPheGlyTyrGlyVal
ArgSerCysLeuGlyArgArgIleAlaGluLeuGluMetGln
LeuLeuLeuSerArgLeuIleGlnLysTyrGluValValLeu
SerProGlyMetGlyGluValLysSerValSerArgIleVal
LeuValProSerLysLysValSerLeuArgPheLeuGlnArg
533
Gln

(4) 下記塩基配列を含む特許請求の範囲第2
項記載の遺伝子

1
T GCC TGG ATG GGG CGC GTA GTC TCT GGC TCT
AAA CTC TTG GCT TCT CAG ACA CGA TCT ATG GCT
GTG TTG AGC CGC ATG AGA CTG AGA TGG GCG CTT
CTG GAC ACT CGT GTG ATG GGC GGC CTC TGC CCA
CAA GGG GGC AGA GGC AAG GCC GCG ATC CCT GCA
GCC CTC CGG GAT CAC GAG AGC ACG GAG GGT CCA
GGA ACA GGT CAA GAC CGA CCG CGC CTG CGG AGT
CTG GCG CAG CTT CCG CGA CCC GGA ACG CTA CGC
TTT TTA TTC CAG CTA TTT CTA CGA GGC TAT GTG

GCG GCT GGG CCA GAT GGG GTC CAG GTA TCT GGC
TAC CTG CAC TTC CTG CTG ACT AAG GAA TTG CTC
AGT CCT CAA GAG ACT GTC GGC ACC TTT CCT GAG
CTG ATC TTG GCT GGG GTA GAC ACG ACA TCC AAT
ACA CTG ACC TGG GGC CTG TAT CAC CTT TCA AAG
AAC CCA GAG ATC CAG GAA GCC TTG CAC AAG GAA
GTG ACT GGT GTG GTA CCC TTC GGG AAG GTG CCC
CAG AAC AAG GAC TTT GCC CAC ATG CCC CTG CTA
AAA GCT GTG ATT AAG GAG ACC CTG CGC CTC TAC
CCT GTG GTT CCC ACA AAC TCC CGG ATC ATC ACA
GAA AAG GAA ACT GAA ATT AAT GGC TTC CTC TTC
CCT AAG AAT ACA CAG TTT GTG TTA TGC CAC TAC
GTG GTG TCC CGA GAT CCC AGT GTC TTT CCT GAG
CCC GAG AGC TTC CAG CCT CAC CGA TGG CTG AGG
AAG AGA GAG GAC GAT AAC TCC GGG ATC CAA CAC
CCA TTT GGC TCT GTG CCC TTT GGC TAT GGG GTT
CGG TCC TGC CTG GGT CGC AGG ATT GCA GAA CTG
GAG ATG CAA CTC CTG CTG TCA AGG CTG ATA CAA
AAG TAT CAG GTG GTC CTG TCT CCC GGG ATG GCA
GAA GTG AAG TCT GTG TCC CGC ATC GTC CTG GTT

CTG CAC TTG CAC GAG CTC CAG GCG CTG AAC AAG
GCC AAG TAC GGC CCA ATG TGG ACA ACC ACC TTT
GGG ACT CGC ACC AAT GTG AAT CTG GCT AGC GCC
CCG CTC TTG GAG CAA GTG ATG AGA CAG GAG GGC
AAG TAC CCC ATA AGA GAC AGC ATG GAG CAG TGG
AAG GAG CAC CGA GAC CAC AAA GGC CTC TCC TAT
GGG ATC TTC ATC ACA CAA GGA CAG CAG TGG TAC
CAT CTG CGT CAT AGT TTG AAT CAG CGG ATG CTG
AAG CCT GCT GAG GCA GCC CTC TAC ACA GAT GCC
TTA AAC GAG GTC ATC AGT GAC TTT ATT GCC CGG
CTG GAC CAG GTG CGG ACA GAG AGT GCA TCA GGG
GAT CAG GTG CCA GAT GTG GCA CAT CTT CTC TAC
CAC CTT GCC TTG GAA GCC ATC TGC TAT ATC CTG
TTT GAG AAA AGG GTT GGC TGC CTG GAG CCC TCC
ATC CCT GAG GAC ACC GCC ACC TTC ATC AGA TCT
GTT GGA CTC ATG TTC AAG AAC TCA GTC TAT GTG
ACT TTC CTT CCC AAG TGG TCT CGG CCT CTG CTG
CCC TTT TGG AAG CGA TAC ATG AAT AAC TGG GAT
AAC ATT TTC TCC TTC GGG GAG AAG ATG ATT CAT
CAA AAA GTC CAG GAG ATA GAA GCC CAG CTA CAG

CCC AGC AAG AAG GTG AGC CTA CGC TTT CTG CAG
AGA CAG TAG TAC CAA GCT GGG CTC CTG CTC CAT
GGG ACT TGT CCA GAA GCC CTG GCA CAG AAG TTC
TTG GCC AGT CTC ACG TCA CAT GTC ACG ATG CCA
GAT TCA ACA GGG GAC CTC TCT GCC CTT CCC ATA
GAC ACC AGA CGT CTG GCA CAA TCT CTA CTG AGC
AGC ACC CAT TTA AGA CAT TAG AGC ACC TCA TAT
CAC AGG ACG GTG CTT GGG TAC AAT TTA AAA TAA
1900
AAT TTA AAA TTC AAA AAA

(5) ラット肝のチトクロムP450_{c11}をコードする
塩基配列を含む組換え体DNA

(6) 微生物細胞内で自己増殖可能な特許請求の範
囲第5項記載の組換え体DNA

(7) 特許請求の範囲第6項記載の組換え体DNA
pLMT25

(8) ラット肝のチトクロムP450_{c11}をコードする
塩基配列を含み、微生物細胞内で自己増殖可能な
DNAを保持する形質転換微生物

(9) 特許請求の範囲第8項記載の微生物エシェリ
キア・コリ(Escherichia coli)JM105/pLMT25

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、チトクロムP450_{c₁}をコードする遺伝子に関する。本発明により得られた遺伝子を微生物細胞などで発現させることにより、該酵素を工業的に生産し、活性型ビタミンD₃の製造プロセスへ利用することができる。

(従来技術および問題点)

チトクロムP450 (以下P450と略する) は微生物から哺乳動物にいたるまで広く生物界に存在するヘム酵素であり、広範囲の脂溶性化合物に対して、1原子酵素を添加する反応を触媒する。P450の示す広範囲の基質特異性は、1つには、P450の分子多様性に起因する。すなわち、生物界には多数のP450分子種が存在し、それぞれのP450分子種は異なる基質特異性を示す。しかしながら、P450に電子を供給する経路は共通であり、哺乳動物の小胞体では、主として、分子内にフラビンアデニンジヌクレオチドとフラビンモノヌクレオチドを含むNADPH-チトクロムP450還元酵素がNADPHから供

給される電子を、それぞれのP450分子種へ伝達する役割をはたす。一方、ミトコンドリアでは、フラビンアデニンジヌクレオチドを含むNADPH-フェレドキシン還元酵素、および、非ヘム鉄を含むフェレドキシンの2種類の酵素が、NADPHからP450への電子伝達に関与する。

活性型ビタミンD₃は、カルシウム代謝調節ホルモンとして、小腸におけるカルシウム、リンの吸収作用を示すほか、骨髓性白血病細胞株などに対する分化誘導作用を示すなど、重要なビタミンの1つである。ビタミンD₃は活性型ビタミンD₃ (1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃) へ活性化されてから生理作用を示す。この活性化は、肝におけるビタミンD₃の25位水酸化による25-ヒドロキシビタミンD₃の生成、ついで、腎における25-ヒドロキシビタミンD₃の1 α 位水酸化による1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃の生成という2つの臓器での代謝交換を必要とする。これらの水酸化反応にP450が関与することは明らかになっていたが、その酵素の性質などは不明であった。

本発明者らは、ラットの肝ミクロソームからビタミンD₃の25位水酸化を触媒するP450分子種を精製し、その性質を明らかにした (S. Hayashi et al., ジャーナル オブ バイオケミストリー, 99巻, 1753-1763頁, 1986年)。また、このP450分子種がオスラットの肝ミクロソームから精製されたP450_{w-1}と免疫化学的に相同性の高いことを見いだした (S. Hayashi et al., ジャーナル オブ バイオケミストリー, 103巻, 853-857頁, 1988年)。しかしながら、P450_{w-1}をコードする遺伝子を酵母細胞に発現させた場合、P450_{w-1}が触媒するテストステロンの16 α 位水酸化活性は検出されたものの、ビタミンD₃の25位水酸化活性は検出できなかったことから、両分子種は互いに異なると考えられた (S. Hayashi et al., ジャーナル オブ バイオケミストリー, 103巻, 858-862頁, 1988年)。一方、H. Dahlack と K. Wikval はウサギの肝ミトコンドリアからビタミンD₃の25位水酸化を触媒するP450分子種の精製を報告した (バイオケミカル ジャーナル, 252巻, 207

-213頁, 1988年)。また、ヒトでは、肝ミトコンドリアでのみビタミンD₃の25位水酸化活性が見い出されている (H. Oftebro et al., ジャーナル オブ リビッド リサーチ, 22巻, 1254-1264頁, 1981年)。したがって、ビタミンD₃の代謝活性化には肝ミトコンドリアのP450の分子種が生理的に重要であることが示唆された。そこで、本発明者らは、最近、ラットの肝ミトコンドリアから、ビタミンD₃の25位水酸化を触媒するP450分子種を、その活性を指標にして、単一にまで精製することに成功した。精製したP450標品は、ビタミンD₃の25位水酸化反応のみを特異的に触媒し、活性発現には、ウシ副腎ミトコンドリアから精製したアドレノドキシニン、および、アドレノドキシニン還元酵素を必要とすることが判った (O. Masumoto et al., ジャーナル オブ バイオロジカルケミストリー, 263巻, 14256-14260頁, 1988年)。近年、種々の動物種のさまざまな臓器から、P450の遺伝子がクローニングされており、これらP450を工業的に生産することも可能である。

P450_{c11} はビタミンD₃の代謝活性化の初発反応を触媒する酵素であり、本酵素を大量生産できれば、活性型ビタミンD₃の工業的製造プロセスへの応用が可能になる。そのために、本発明者らは、誠意努力してラット肝から、P450_{c11} をコードする遺伝子のクローニングに成功した。

これにより、P450_{c11} を生産することが可能になった。

すなわち、本発明の第1の目的は、ラット肝P450_{c11} をコードする遺伝子を提供することにある。好ましい遺伝子は、下記アミノ酸配列に対応する塩基配列を含む遺伝子である。

```

1
MetAlaValLeuSerArgMetArgLeuArgTrpAlaLeuLeu
AspThrArgValMetGlyHisGlyLeuCysProGlnGlyAla
ArgAlaLysAlaAlaIleProAlaAlaLeuArgAspHisGlu
SerThrGluGlyProGlyThrGlyGlnAspArgProArgLeu
ArgSerLeuAlaGluLeuProGlyProGlyThrLeuArgPhe
LeuPheGlnLeuPheLeuArgGlyTyrValLeuHisLeuHis
GluLeuGlnAlaLeuAsnLysAlaLysTyrGlyProMetTrp
ThrThrThrPheGlyThrArgThrAsnValAsnLeuAlaSer

```

```

LysGluThrLeuArgLeuTyrProValValProThrAsnSer
ArgIleIleThrGluLysGluThrGluIleAsnGlyPheLeu
PheProLysAsnThrGlnPheValLeuCysHisTyrValVal
SerArgAspProSerValPheProGluProGluSerPheGln
ProHisArgTrpLeuArgLysArgGluAspAspAsnSerGly
IleGlnHisProPheGlySerValProPheGlyTyrGlyVal
ArgSerCysLeuGlyArgArgIleAlaGluLeuGluMetGln
LeuLeuLeuSerArgLeuIleGlnLysTyrGluValValLeu
SerProGlyMetGlyGluValLysSerValSerArgIleVal
LeuValProSerLysLysValSerLeuArgPheLeuGlnArg
533
Gln

```

さらに好ましいものは下記塩基配列を含む遺伝子である。

```

1
T GCC TGG ATG GGG CGC GTA GTC TCT GGC TCT
AAA CTC TTG GCT TCT CAG ACA CGA TCT ATG GCT
GTG TTG AGC CGC ATG AGA CTG AGA TGG GCG CTT
CTG GAC ACT CGT GTC ATG GGC GGC CTC TGC CCA
CAA GGG GCC AGA GCC AAG GCC GCG ATC CCT GCA
GCC CTC CGG GAT CAC GAG AGC ACG GAG GGT CCA
GGA ACA GGT CAA GAC CGA CCG CGC CTG CGG AGT

```

```

AlaProLeuLeuGluGlnValMetArgGlnGluGlyLysTyr
ProIleArgAspSerMetGluGlnTrpLysGluHisArgAsp
HisLysGlyLeuSerTyrGlyIlePheIleThrGlnGlyGln
GlnTrpTyrHisLeuArgHisSerLeuAsnGlnArgMetLeu
LysProAlaGluAlaAlaLeuTyrThrAspAlaLeuAsnGlu
ValIleSerAspPheIleAlaArgLeuAspGlnValArgThr
GluSerAlaSerGlyAspGlnValProAspValAlaHisLeu
LeuTyrHisLeuAlaLeuGluAlaIleCysTyrIleLeuPhe
GluLysArgValGlyCysLeuGluProSerIleProGluAsp
ThrAlaThrPheIleArgSerValGlyLeuMetPheLysAsn
SerValTyrValThrPheLeuProLysTrpSerArgProLeu
LeuProPheTrpLysArgTyrMetAsnAsnTrpAspAsnIle
PheSerPheGlyGluLysMetIleHisGlnLysValGlnGlu
IleGluAlaGlnLeuGlnAlaAlaGlyProAspGlyValGln
ValSerGlyTyrLeuHisPheLeuLeuThrLysGluLeuLeu
SerProGlnGluThrValGlyThrPheProGluLeuIleLeu
AlaGlyValAspThrThrSerAsnThrLeuThrTrpAlaLeu
TyrHisLeuSerLysAsnProGluIleGlnGluAlaLeuHis
LysGluValThrGlyValValProPheGlyLysValProGln
AsnLysAspPheAlaHisMetProLeuLeuLysAlaValIle

```

```

CTG GCG CAG CTT CCG GCA CCC GGA ACG CTA CGC
TTT TTA TTC CAG CTA TTT CTA CGA GGC TAT GTG
CTG CAC TTG CAC GAG CTC CAG GCG CTG AAC AAG
GCC AAG TAC GGC CCA ATG TGG ACA ACC ACC TTT
GGG ACT CGC ACC AAT GTG AAT CTG GCT AGC GCC
CCG CTC TTG GAG CAA GTG ATG AGA CAG GAG GGC
AAG TAC CCC ATA AGA GAC AGC ATG GAG CAG TGG
AAG GAG CAC CGA GAC CAC AAA GGC CTC TCC TAT
GGG ATC TTC ATC ACA CAA GGA CAG CAG TGG TAC
CAT CTG CGT CAT AGT TTG AAT CAG CGG ATG CTG
AAG CCT GCT GAG GCA GCC CTC TAC ACA GAT GCC
TTA AAC GAG GTC ATC AGT GAC TTT ATT GCC CGG
CTG GAC CAG GTG CGG ACA GAG AGT GCA TCA GGG
GAT CAG CTG CCA GAT GTG GCA CAT CTT CTC TAC
CAC CTT GCC TTG GAA GCC ATC TGC TAT ATC CTG
TTT GAG AAA AGG GTT GGC TGC CTG GAG CCC TCC
ATC CCT GAG GAC ACC GCC ACC TTC ATC AGA TCT
GTT GGA CTC ATG TTC AAG AAC TCA GTC TAT GTC
ACT TTC CTT CCC AAG TGG TCT CGG CCT CTG CTG
CCC TTT TGG AAG CGA TAC ATG AAT AAC TGG GAT

```

AAC ATT TTC TCC TTC GGG GAG AAG ATG ATT CAT
 CAA AAA GTC CAG GAG ATA GAA GCC CAG CTA CAG
 GCG GCT GGG CCA GAT GGG GTC CAG GTA TCT GGC
 TAC CTG CAC TTC CTG CTG ACT AAG GAA TTG CTC
 AGT CCT CAA GAG ACT GTC GGC ACC TTT CCT GAG
 CTG ATC TTG GCT GGG GTA GAC ACG ACA TCC AAT
 ACA CTG ACC TGG GCC CTG TAT CAC CTT TCA AAG
 AAC CCA GAG ATC CAG GAA GCC TTG CAC AAG GAA
 GTG ACT GGT GTG GTA CCC TTC GGG AAG GTG CCC
 CAG AAC AAG GAC TTT GCC CAC ATG CCC CTG CTA
 AAA GCT GTG ATT AAG GAG ACC CTG CGC CTC TAC
 CCT GTG GTT CCC ACA AAC TCC CGG ATC ATC ACA
 GAA AAG GAA ACT GAA ATT AAT GGC TTC CTC TTC
 CCT AAG AAT ACA CAG TTT GTG TTA TGC CAC TAC
 GTG GTG TCC CGA GAT CCC AGT GTC TTT CCT GAG
 CCC GAG AGC TTC CAG CCT CAC CGA TGG CTG AGG
 AAG AGA GAG GAC GAT AAC TCC GGG ATC CAA CAC
 CCA TTT GGC TCT GTG CCC TTT GGC TAT GGG GTT
 CGG TCC TGC CTG GGT CGC AGG ATT GCA GAA CTG
 GAG ATG CAA CTC CTG CTG TCA AGG CTG ATA CAA

AAG TAT GAG GTG GTC CTG TCT CCC GGG ATG GGA
 GAA GTG AAG TCT GTG TCC CGC ATC GTC CTG GTT
 CCC AGC AAG AAG GTG AGC CTA CGC TTT CTG CAG
 AGA CAG TAG TAC CAA GCT GGG CTC CTG CTC CAT
 GGG ACT TGT CCA GAA GCC CTG GCA CAG AAG TTC
 TTG GCC AGT CTC ACG TCA CAT GTC ACG ATG CCA
 GAT TCA ACA GGG GAC CTC TCT GCC CTT CCC ATA
 GAC ACC AGA CGT CTG GCA CAA TCT CTA CTG AGC
 AGC ACC CAT TTA AGA CAT TAG AGC ACC TCA TAT
 CAC AGG ACG GTG CTT GGG TAC AAT TTA AAA TAA
 AAT TTA AAA TTC AAA AAA¹⁹⁰⁰

本発明の第2の目的は、ラット肝P450_{c11}をコード遺伝子を含む組換え体DNAを提供することにある。好ましいDNAは、宿主細胞内で自己増殖可能な、すなわち、自己増殖するのに必要な塩基配列を含むDNAであり、特に好ましいのは、本明細書でpLMT25と命名したものである。さらに、本発明の第3の目的は、ラット肝P450_{c11}をコードする塩基配列を含み、微生物細胞内で自己増殖可能なDNAを保持する形質転換微生物を提供する

ことにある。特に好ましい微生物は本明細書中で、*E. coli* JM105/pLMT25と命名したものである。

一般に、遺伝子組換え技術により、特定の酵素あるいは蛋白質を発現させるためには、次の工程が必要である。

(1) 目的とする酵素をコードするDNA断片の調製

一般に、ある酵素をコードする遺伝子断片の調製は、その酵素に対応した塩基配列を含む遺伝子を提供する細胞から取り出し、制限酵素などで処理することにより、行なうことができるが、真核生物細胞の遺伝子はそのままでは原核生物中で発現しないことが多いので、mRNAを調製し、これに相補的なcDNAを作製する方が便利である。

本発明のラット肝P450_{c11}をコードする遺伝子は、ラット肝から調製したmRNAを用いて、ラムダgt11をベクターとするcDNAライブラリーを作製し、このライブラリーをP450_{c11}に対する抗体を用いた免疫化学的手法によりスクリーニングして取得した。しかしながら、cDNAのクローニング方法は、

これに限るわけではなく、例えば、mRNAから逆転写酵素により作製した2本鎖cDNAをホモポリマー法で、pBR322などのベクターに挿入する方法、Okayaama-Bergのクローニングベクター（ファルマシア社）など市販のクローニングベクターを用いる方法など、いずれの方法でもよい。

また、cDNAの選抜方法に関しても、免疫化学的手法のほかに、合成DNAを用いたハイブリダイゼーションによるスクリーニング法、ポジティブハイブリダイゼーショントランスレーションアッセイを用いたスクリーニング法、目的とする酵素機能を欠損した変異株における変異の相補性を指標としたスクリーニング法など、種々の方法を用いることができる。選抜取得したcDNAは、その塩基配列を決定することにより、P450_{c11}をコードする遺伝子であることを確認することができる。

(2) 組換え体DNAの製造

目的とする遺伝子を含むDNA断片は、そのまま宿主（微生物）細胞に入れても増殖しないので、プラスミドのような細胞内で増殖可能な染色体外

遺伝子をベクターとして、組換え体DNAを複製する。ベクターとしては、宿主細胞内での複製に必要な遺伝情報を含み、自律的に増殖できるものであって、しかも、宿主細胞からの単離精製が容易であり、検出可能なマーカーを有することが望ましい。種々のベクターが市販されており、pBR322、pUC19などが利用できる。ベクターの切断に用いる制限酵素類も市販されており、これらのベクターへのDNAの挿入方法は公知である。

(3) 形質転換体の製造および発現

組換え体DNAを適当な宿主細胞、例えば、大腸菌、酵母等の微生物細胞、あるいは、動物細胞などへ導入することにより、P450_{c1}を産生する形質転換体を製造することができる。DNAの導入方法は、公知の手法に従い、例えば、CaCl₂処理したコンピテント細胞の利用、プロトプラスト法、リン酸カルシウム法、電気せん孔法などを用いることができる。また、それぞれの宿主細胞に適した発現ベクターを用いることが可能であり、大腸菌用発現ベクターは種々市販されている。酵

母での発現には、PGKプロモーター、ADHプロモーター、GAL10プロモーターなどを含む発現ベクターが使用可能であり、また、動物細胞での発現には、SV40プロモーターを含む発現ベクターなどが利用できる。

サル腎臓由来の培養細胞COS 1細胞は、P450_{c1}の活性発現に必要なアドレノドキシン、アドレノドキシ還元酵素の活性を有しているので、この細胞にP450_{c1}を発現させることにより、ビタミンD₃の25位水酸化反応を行なわせることができる。また、アドレノドキシン、アドレノドキシ還元酵素については、これら酵素のcDNAが既にクローニングされており、今回のP450_{c1}、cDNAとともに微生物細胞へ導入することにより、微生物細胞内で哺乳動物のミトコンドリア電子伝達系を構成し、ビタミンD₃の25位水酸化反応を触媒する微生物細胞を取得することができる。これらの組換え体細胞は、活性型ビタミンD₃の製造プロセスへ応用することが可能である。

(実施例)

以下に実施例をあげ、本発明をより詳細に説明する。本発明は以下の実施例にのみ限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更をすることができることはいうまでもない。

実施例1 ラット肝mRNAの調製

ウイスター系雄性ラットの肝約1gをただちに10mM 酢酸ナトリウム(pH 4~5)、1mM DTT、20mM EDTAを含む8M グアニジン塩酸溶液30mlとともに、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジネートを、4,000rpm 10分間遠心し、上清をガーゼで濾過した。これに等容のエタノールを加え、よく攪拌した後、-20℃で60分間保冷した。4,000rpm、15分間の遠心分離により得られる沈澱を回収し、再び8Mグアニジン塩酸溶液30mlに溶解し、1/2容のエタノールを添加し、-20℃で60分間保冷した。4,000rpm、10分間遠心分離し得られる沈澱に対して、上記エタノール沈澱を繰り返す、最終的に、沈澱を10mlの滅菌水に溶解した。2倍容のエタノールを加え、-20℃で15分間保冷したのち、沈澱を回収し、再び9.

5 mlの滅菌水に溶解した。これに0.5 ml、3M酢酸ナトリウム(pH 4~5)を加え、さらに20mlのエタノールを添加し、-20℃ 15分間保冷した。遠心分離により沈澱を回収し、エタノールで洗浄後、バキュームオープンで乾燥させたのち、滅菌水に溶解した。

つぎに、得られたRNAをオリゴ(dT)セルロースカラムに通し、ポリ(A)を有するmRNAを分画した。滅菌水に溶解したRNAに、2倍容の平衡化バッファー(0.5M NaCl, 10mM トリス塩酸, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.1% SDS)を加え、65℃で5分間熱処理を施した。これを、あらかじめ平衡化バッファーを通したオリゴ(dT)セルロースカラムにかけ、10倍容の平衡化バッファーで洗浄した。透過り画分のA₂₆₀の値がゼロであることを確認したのち、カラムに吸着したポリ(A)RNAを滅菌水で溶出した。

実施例2 cDNAライブラリーの作製

調製したmRNAからのcDNA合成は、逆転写酵素によるmRNAに相補的なcDNAの合成、リボヌクレアー

ゼHによるRNA鎖へのニックとギャップの導入、大腸菌DNAポリメラーゼIによる修復合成反応を利用して行なった。反応はすべてファルマシア社から市販されているcDNA合成キットを用いて、そのプロトコールに従った。すなわち、約5 μ gのポリ(A) RNAをエッペンドルフ管にとり滅菌水を加えて全容を20 μ lとした。これを65℃で10分間加熱したのち、氷中で急冷した。ファーストストランドリアクションミックス(First-strand Reaction Mix)12 μ lにDTT溶液1 μ lを加え、ついで上記熱変性RNAを加えたのち、37℃で1時間保温した。これをセカンドストランドリアクションミックス(Second-Strand Reaction mix)67 μ lに添加し、12℃で1時間、続いて22℃で1時間保温した。さらに、Klenow酵素1 μ lを添加したのち、37℃で30分保冷した。反応混液を100 μ lのフェノール・クロロホルム(1:1)で処理したのち、水相をSephacryl® S-200のスパンカラムにかけ、cDNAを回収した。回収したcDNAに、EcoRIアダプター5 μ l、ATP

溶液1 μ l、T4DNAリガーゼ3 μ lを加え、12℃で終夜保温し、cDNAの両端にEcoRIアダプターを付加した。65℃、10分間の熱処理によりT4リガーゼを変性させたのち、ATP溶液10 μ l、T4ポリヌクレオチドキナーゼ1 μ lを加え、37℃、30分間保温し、5'末端をリン酸化した。これを100 μ lのフェノール・クロロホルム処理したのち、水相をスパンカラムにかけ、cDNAを回収した。回収したDNAを λ gt11ベクターのEcoRI部位に挿入した。

続いて、アマーシャム社から市販されているcDNAクローニングシステム λ gt11に添付されたパッケージングエクストラクトを用いて、インビトロパッケージングを行ない、大腸菌Y1090株に感染させることにより、cDNAライブラリーを作製した。パッケージングの方法は、製品に添付されたプロトコールに従った。

実施例3 P450_{c11} cDNA クローンのスクリーニング

cDNAライブラリーからのP450_{c11} cDNA クローンの選抜には、P450_{c11} に対する抗体を用いたス

クリーニング法を実施した。抗体は、精製P450_{c11}、標品をRibiアジュバントと混合し、Balb/c系雌性マウスを免疫することにより、調製した。作製したcDNAライブラリーを、プレートあたり10⁶個のブランクが生成するように広げた。プレートに、あらかじめ10 mM IPTG(イソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド)に浸し、風乾しておいたニトロセルロースフィルターを重ね、37℃で3時間、ついで、4℃で1時間インキュベートした。プレートからはがしたフィルターを、TBS(50mM トリス塩酸、pH8.0、150mM NaCl)で洗浄後、3%ゼラチンを含むTBS中にフィルターを浸し、室温で終夜インキュベートした。フィルターを0.05% ツイン20を含むTBS中で15分間ずつ6回洗浄した。ついで、¹²⁵I標識抗マウスIgGを添加した1%ゼラチンを含むTBS中に浸し、室温で2時間インキュベートしたのち、0.05%ゼラチンを含むTBSで1回、再び0.05% ツイン20を含むTBS中で1回洗浄し、フィルターを風乾した。フィルターは、X線フィルムはさんで-80℃で終

夜露光した。

作製したcDNAライブラリーの1.4 \times 10⁶ ブランクについて、上記スクリーニングを実施した結果、10コのポジティブ ブランクを得た。これらのブランクからファージDNAを調製し、EcoRIで切断することにより、cDNAインサートを回収し、pUC19のEcoRI部位にサブクローニングした。これらのうち、最長のcDNAインサート(1.9kb)を含むクローンをpLMT25と命名した。

実施例4 pLMT25の制限酵素地図の作製

上記プラスミドを保持する大腸菌JM105/PLMT25を50 μ g/ μ lアンピシリンを含むL培地(1 μ l中にバクトトリプトン10g、酵母エキストラクト5g、NaCl10gを含む)中で培養し、バーンボイムードリの方法に従って、プラスミドDNAを調製した。プラスミドDNAは、種々の制限酵素で切断し、切断DNA断片のサイズを0.8~1.0%アガロースゲル電気泳動で分析した。その結果、第2図に示す制限酵素地図を得た。

実施例5 cDNAインサートの塩基配列の決定およ

ラット肝臓P450_{c11}のアミノ酸配列

cDNAインサート1.9Kbの塩基配列を決定した。pUC 19プラスミドのプライマーあるいは合成DNAをプライマーとして、7-デアザdGTPおよびシークエナーゼを用いたジデオキシ法により塩基配列を決定した。

決定したpLMT25のcDNAインサートの全塩基配列を第1図に示す。塩基配列の中から、最長のオープンリーディングフレームを検索した結果、第1図に示すように、塩基番号59から1657番目までが、533アミノ酸をコードできるオープンリーディングフレームであることが判明した。蛋白質の読み枠としては、塩基を1つずつずらした他の2つの読み枠も考えられるが、これらでは塩基配列の途中に終止コドンがあらわれ、みかけの分子量52,500ダルトンのP450_{c11}をコードできるとは思えなかった。

精製ラット肝P450_{c11}(ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、263巻、14256-14260頁にその方法を記載)のN末端アミノ酸配列をエ

コンドリアのビタミンD₃ 25位水酸化酵素と5β-コレスタン-3α, 7α, 12α-トリオール27位水酸化酵素は酵素学的に同一のP450分子種と考えられている。したがって、本発明で決定したアミノ酸配列はラット肝ミトコンドリアのビタミンD₃の25位水酸化反応を触媒するP450_{c11}に相当することが明らかになった。

一方、P450_{c11}などのミトコンドリアに局在する蛋白質の多くは、細胞質で分子量の大きい前駆体として合成されたのち、ミトコンドリアへ郵送されるとともに、N末端のミトコンドリア輸送シグナルが切断され、成熟酵素となることが知られている。第1図に示すN末端から32番目のアミノ酸配列中には、ミトコンドリア輸送シグナルの特徴と考えられる両親媒性がみられた。すなわち、32アミノ酸残基の配列は、リジン残基1コとアルギニン残基5コを含み、他に18コの疎水性アミノ酸を含んでいた。以上の結果から、ラット肝P450_{c11}は、32アミノ酸残基から成るミトコンドリア輸送シグナルを有し、成熟酵素の分子量が

ドマン法により決定した結果、N末端からAla-Ile-Pro-Ala-Ala-の配列を読みとることができた。この配列は、第1図に示すアミノ酸配列の33番目から37番目と完全に一致した。したがって、アミノ酸残基33番目から533番目までの501アミノ酸残基がP450_{c11}をコードする領域であることが判明した。また、この501アミノ酸の配列中には、すべてのP450分子種で保存されている、ヘム結合に関与するシステイン残基が479アミノ酸残基目に見出され、その前後のアミノ酸配列も他のP450分子種とよく似ていた。

決定したラット肝P450_{c11}のアミノ酸配列について、他の蛋白質との相同性を、NBRFデータベースを用いて比較した。その結果、Anderssonらが報告したウサギ肝ミトコンドリアの5β-コレスタン-3α, 7α, 12α-トリオールの26(あるいは27)位水酸化を触媒するP450分子種と73%の一致を示した。しかしながら、他のP450の分子種とは、30%以上の相同性は見られなかった。本発明者らの研究から、ラット肝ミト

57,182ダルトン(501アミノ酸残基)であることが明らかになった。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、pLMT25のcDNAインサート部分の塩基配列と、それから推定されるラット肝P450_{c11}のアミノ酸配列を示す。P450_{c11}のコーディング領域は、塩基番号59から1657番目に相当する。また、このうち、塩基番号155から1657番目が成熟P450_{c11}に相当する。図中、矢印で示した部位はシグナル配列の切断位置を、また、下線を施した5アミノ酸残基は精製P450_{c11}標品で決定したN末端アミノ酸配列を示す。P450で配列の保存されたヘム結合領域に破線を施した。

第2図は、ラット肝P450_{c11}をコードするcDNAクローンpLMT25の制限酵素地図を示す。図中、太い黒線は本酵素をコードするDNA領域を示す。また、図中の矢印は、DNA塩基配列を決定した方向および領域を示す。

第 1 図 (その 3)

GTT CGG TCG TGC CTC GGT CGC AGC ATT GCA GAA CTG GAG ATG CAA CTC CTG CTG TCA AGG CTG ATA CAA AAG TAT	1558
Val Arg Ser Cys Leu Gly Arg Arg Ile Ala Glu Leu Glu Met Glu Leu Leu Leu Ser Arg Leu Ile Gln Lys Tyr	500
GAG CTC CTC CTG TCT CCC GGC ATG GGA GAA GTG AAG TCT GTG TCC CGC ATC GTC CTG GTT CCC AGC AAG AAG GTG	1633
Glu Val Val Leu Ser Pro Gly Met Gly Glu Val Lys Ser Val Ser Arg Ile Val Leu Val Pro Ser Lys Lys Val	525
AGC CTA CGC TTT CTG CAG AGA CAG TAG TAC CAA GCT GGC CTC CTG CTC CAT GGG ACT TGT CCA GAA GCC CTG GCA	1708
Ser Leu Arg Phe Leu Gln Arg Gln ***	533
CAG AAG TTC TTG GCC AGT CTC ACC TCA CAT GTC ACC ATG CCA CAT TCA ACA GGG GAC CTC TCT GCC CTT CCC ATA	1783
GAC ACC AGA CGT CTG GCA CAA TCT CTA CTG AGC AGC ACC CAT TTA AGA CAT TAG AGC ACC TCA TAT CAC AGG ACC	1858
GTG CTT GGG TAC AAT TTA AAA TAA AAT TTA AAA TTC AAA AAA	1900

第 2 図

